

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 63-123392
(43)Date of publication of application : 27.05.1988

(51)Int.Cl. C12P 19/26
C12P 19/04

(21)Application number : 61-269734 (71)Applicant : DENKI KAGAKU KOGYO KK
(22)Date of filing : 14.11.1986 (72)Inventor : HASHIMOTO MASAMICHI
SAEGUSA HARUHISA
CHIBA SUSUMU
KITAGAWA HIROYUKI
MIYOSHI TERUZO

(54) PRODUCTION OF HYALURONIC ACID

(57)Abstract:

PURPOSE: To produce hyaluronic acid in high yield, stably and in uniform yield, by cultivating a bacterium belonging to the genus *Streptococcus*, from which nutrition demanding properties are partially removed, in a nutritive medium.

CONSTITUTION: *Streptococcus equi* ATCC9527 is cultivated in a medium containing polypeptone, yeast essence and glucose, the cell in a logarithmic proliferation period is collected, washed and treated with N-methyl-N'-nitro-N- nitroguanidine to give *Streptococcus equi* FM100 (FERM-P 9027) from which nutrition demanding properties are partially removed and which can grow in an artificial synthetic medium consisting only of a medium component in which ATCC strain, parent strain, can not grow. the strain is subjected to aerated spinner culture in a nutritive medium containing a carbon source, a nitrogen source, inorganic salt, etc., and, if necessary, amino acid, vitamin, etc., at pH6.5W7 at 30W35° C to give hyaluronic acid.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑨ 日本国特許庁 (JP) ⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A) 昭63-123392

⑫ Int.Cl.
C 12 P 19/26
19/04

識別記号 厅内整理番号
8515-4B
A-8515-4B

⑬ 公開 昭和63年(1988)5月27日

審査請求 未請求 発明の数 2 (全5頁)

⑭ 発明の名称 ヒアルロン酸の製造方法

⑮ 特願 昭61-269734
⑯ 出願 昭61(1986)11月14日

⑰ 発明者 橋本 正道 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社
中央研究所内

⑰ 発明者 三枝 治久 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社
中央研究所内

⑰ 発明者 千葉 晋 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社
中央研究所内

⑰ 発明者 北川 広進 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社
中央研究所内

⑰ 発明者 三好 照三 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社
中央研究所内

⑰ 出願人 電気化学工業株式会社 東京都千代田区有楽町1丁目4番1号

明細書

1. 発明の名称

ヒアルロン酸の製造方法

2. 審査請求の範囲

- (1) 栄養要求性が部分的に解除されたストレプトコクカス・エキを培養し、ヒアルロン酸を生成させしめる方法を特徴とするヒアルロン酸の製造法。
- (2) 細胞の増殖しない表1に示す培地成分から成る人工合成培地に生育できる栄養要求性が部分的に解除されたストレプトコクカス・エキを培養し、ヒアルロン酸を生成させしめる方法を特徴とするヒアルロン酸の製造法。

特開昭63-123392 (2)

培地成分	培地成分
グルコース	アセニン
L-アラニン	アアコーン
L-アルギニン	ワラシル
L-アスパラギン	D,L-ペントテン酸カルボン酸
L-アスパラギン酸	リボフラビン
L-シスチイン	チアミン
L-グルタミン	ナイアシン
L-グルタミン酸	ビリドキサミン
グリシン	ビリドキサール
L-ヒビテイン	補酸
L-ヒドロキシプロリン	ビオチン
L-イソロイシン	パラアミノ安息香酸
L-ロイシン	NAD
L-リジン	K ₃ HPO ₄
L-メチオニン	K ₂ HPO ₄
L-フェニルアラニン	MgSO ₄ ·7H ₂ O
L-プロリジン	FeSO ₄ ·7H ₂ O
L-セリン	MnSO ₄ ·4H ₂ O
L-スレオニン	NaCZ
L-トリプトファン	NaC ₆ H ₅ O ₃ ·3H ₂ O ⁺
L-チロシン	NaHCO ₃
L-バリン	CaC ₂ O ₄ ·2H ₂ O

3. 発明の詳細な説明

〔建築上の利用分野〕

本発明は、織物法によるヒアルロン酸の製造法に関する。さらに詳しくは、栄養要求性が部分的に解消されたストレプトコッカス・エキを培養し、ヒアルロン酸を生成させしめるることを特徴とするヒアルロン酸の製造法に関する。

〔従来の技術〕

従来ヒアルロン酸はニワトリのトサカ、牛の喉の角子体又は扁帯等より抽出によつて得られていた。しかしながら抽出法によるヒアルロン酸製造は、分離精製が非常に困難等の欠点を有してゐた。

その欠点を改良するために、ヒアルロン酸を生成する能力を有する微生物を培養し、その培養液から直接ヒアルロン酸を採取する方法が開示されている（特明昭58-56692号公報、特開昭61-63294号公報）。

さらに、微生物を培養し、ヒアルロン酸を採取する方法について、培養のロットごと生成量を安定化させるため、突然変異株を用いる方法が開示

まれてゐる(図版図 6.1 = 2.1.2.3.2.4 参照)。

本発明者は、ヒアルロン酸産生細胞を有するストレプトコッカス属の微生物を、培養液のpH 7.5～9.0にコントロールすることにより、高分子量のヒアルロン酸を生成蓄積せしめる方法についてすでに特許した（特願昭61-170943号明細書）。

〔発明が解決しようとする問題点〕

微生物を培養して、ヒアルロン酸の生産を行なうと、ロットごとの生産量が不安定であり、工業的に実施する段階に、大きな問題となる。

〔問題点を解決するための手段〕

本発明者らは、かかる問題を解決すべく、遺々研究を行なつた結果、栄養要求性が部分的に解除されたストレプトコッカス・エキが意外にも活性よりも、高吸着で、しかも吸着のバラフキが少なく安定にヒアルロン酸を生成することを見い出し本発明を完成するに至つた。

すなわち本発明は、発達要求性が部分的に解消されたストレプトコスカス・玉子を接着し、ヒアル

特開昭63-123392(3)

ルロン酸を生成蓄積せしめることを特徴とする複雑法によるヒアルロン酸の製造法である。

以下、本発明について具体的に説明する。

本発明の栄養要求性が部分的に解除されたストレプトコクカス・エキスは、ヒアルロン酸生成能を有するストレプトコクカス・エキスの突然変異株の中から收得することが出来る。

例えば、ストレプトコクカス・エキス ATCC9527 を用い、ポリペプトン 1.5%、酵母エキス 0.5%、グルコース 2% の培地にて、33℃で培養し、対数増殖期の菌を、低温で遠心分離により集団し、生理食塩水を用いて、無菌的に 3 回洗浄する。 N-メチル-β-ニトロ-β-ニトロソグアニジン 50 μg/ml を含む 5.0、0.05M リン酸緩衝液中、30℃で 1 時間振盪したのち、氷冷する。ついで、生理食塩水を用いて、低温で菌体を 3 回洗浄した後、ポリペプトン 1.5%、酵母エキス 0.5%、グルコース 2% の培地で、33℃、3 時間培養し、また生理食塩水を用いて、低温で菌体を 3 回洗浄する。表 2 に示す人工合成功地で、

33℃、7 日間液体培養し、増殖してきた培養液をさらに、新しい同じ人工合成功地にうえつぎ、この操作を 3 回くりかえす。

次に寒天を含む同じ組成の培地上に播布し、コロニーを分離し、ストレプトコクカス・エキス M 100 を得る。

本菌株は、工業技術院微生物工業技術研究所に、竣工研磨密第 9027 号として受託されている。ストレプトコクカス M-100 は、部分的に栄養要求性が解除され、親株である ATCC 9527 が生育できない表 2 に示す培地成分だけからなる人工合成功地によく生育することができる。

表 2

培地成分	濃度 (μg/L)	培地成分	濃度 (μg/L)
グルコース	10000	D・L-バントテン酸カルシウム	0.5
L-アラニン	200	リボフラビン	0.5
L-アルギニン	200	チアミン	0.5
L-アスパラギン	200	ナイアシン	1.0
L-アスパラギン酸	200	ビドキサミン	1.0
L-シスチジン	100	ビドキサーベ	1.0
L-グルタミン	350	葉酸	0.005
L-グルタミン酸	1000	ビオチン	0.0025
グリシン	400	パラアミノ安息香酸	0.1
L-ヒスチジン	400	NAD	0.5
L-ヒドロキシプロリン	50	K ₃ HPo ₄	500
L-イソロイシン	200	KH ₂ PO ₄	14000
L-ロイシン	200	MgSO ₄ ·7H ₂ O	200
L-リジン	200	FeSO ₄ ·7H ₂ O	10
L-メチオニン	200	MnSO ₄ ·4H ₂ O	10
L-フェニルアラニン	200	NaCl	10
L-プロリン	200	NaC ₆ H ₅ O ₄ ·3H ₂ O(無水ソーダ)	10000
L-セリン	200	NaHCO ₃	500
L-スレオニン	200	CaCO ₃ ·2H ₂ O	60
L-トリプトファン	200		
L-チロシン	200		
L-バリン	200		
アラニン	20		
グアニン	20		
ウラシル	20		

特開昭63-123392 (4)

ストレプトコツカス・エキスM・100の発達
潜伏性は表3に示すとおりである。

保水性	吸着率	吸着率	保水性	吸着率	保水性
なし	しーメオコン	あり	DL-ペントデンカルボン酸	あり	あり
あり	レーフニユアルアロコン	あり	リボラビン	あり	あり
なし	レーブロリン	なし	ナシン	あり	あり
あり	レーセリン	なし	ナイシン	なし	なし
あり	レーセレオニン	あり	ビリドキサン	なし	なし
なし	レーネロシン	なし	ビリドキサール	あり	あり
なし	レートリオフラン	なし	ジオ	なし	なし
あり	レーパリン	あり	ビオチン	あり	あり
なし	レーリオシン	あり	ペラミノ安息香酸	なし	なし
あり	レーロイコン	あり	NAO	あり	あり
なし	レーリン	なし	ロラシル	なし	なし

特定の栄養素の要求性が解消された菌株を取得するときは、表2の培地から、その栄養素を除いた培地を作成し、上述と同様の操作を行なう。

また栄養要求性が部分的に解除された菌株は、とくに入為的に変異処理を行なわなくても、上述のようなうえつぎ操作をくりかえすことにより選択することもできる。

本発明に用いる培地は通常の微生物の培養に用いるもので良く、グルコース、フラクトース、ガラクトース、シュークロース、等の炭素源、リン酸第1カリウム、リン酸第2カリウム、硫酸マグネシウム、亜硫酸ソーダ、ナオ硫酸ソーダ、リン酸アンモニウム等の無機塩類、ポリペプトン、カゼミノ酸、酵母エキス、コーンステイーブリガー、大豆加水分解液等の有機炭素源の他、必要に応じて各種アミノ酸、ビタミン類等が好適に用いられる。

これらの培地成分は一括仕込み又は分別添加いずれでも採用可能である。

本発明の培養は、通気・攪拌培養等の公知の方

先でよく、施肥量は30~35kgが好ましい。

培養液の出は、菌の生育と共に低下するため、カゼソーグ、カゼカリ、アンモニア等の出糞薬剤を盛加し、出6.5~7.0にコントロールする。

このようにして培養すると、ヒアルロン酸の生成と共に、培養液の粘度が次第に上昇してくる。使用炭素源が培養液中で消費された時点で培養を停止し、遠心分離による除菌後、アルコール等の有機溶媒による析出、紫外線による脱塩等の簡単な公知有機法により、高収率でヒアルロン酸が得られる。

〔 天 無 例 〕

次に実施例により、本発明を詳しく説明するが、
本発明はこれに限定されるものではない。

案例 1

グルコース 2%、リン酸第一カリウム 0.2%、
硫酸マグネシウム 7 水塩 0.05%、チオ硫酸ソーダ
0.1%、ポリペプトン 1.0% 鹿母エキス 0.5%
からなる pH 8.5 の培養液 1 L に同一培地からなる
ストレプトコッカス・エキス FM-100 の菌液を

特開昭63-123392 (5)

波10mmを発振し、通気量1.5vvm、攪拌200回転/分、温度33℃でカセソーダでpHを8.5にコントロールしながら培養し、15時間後に、グルコース2%を分波し、グルコースが全部消費された時点で培養を停止した。

培養液を培養でpHに調整後、滅菌水で2倍希釈し、遠心分離により除菌した。得られた除菌液をエチルアルコールを加え、ヒアルロン酸ソーダを析出せしめる。これをろ別した後、水に溶解し、セチルピリジニウムクロライドを加え、生じた沈殿をろり出し、2%食塩水に再溶解後、再びエチルアルコールによる析出をくり返す。得られたヒアルロン酸ソーダを滅菌で滅菌充填して、培養液1mlあたり7.2gの白色ヒアルロン酸ソーダを得た。得られたヒアルロン酸ソーダは、赤外線吸収スペクトル、C-13核磁気共鳴スペクトル、ストレプトマイセスのヒアルロニダーゼによる分解実験でヒアルロン酸ソーダであることが確認された。上記と同様の培養を4回くりかえし、全部で5バッテ行なった結果を表すに示す。

表 3

バッテ数	収量g(培養液1mlあたり)
1	7.2
2	7.1
3	7.0
4	7.3
5	7.1

さらに長期的に培養を行なつたが、ヒアルロン酸収量は常に安定していた。

比較例1

親株であるストレプトコッカス・エキATCC9527を実験例1と同様にして、5回くりかえしたが、得られたヒアルロン酸ソーダはそれぞれ、4.5g、2.3g、3.5g、1.2g、3.9gであり、収量は実験例1に比較して、低く、またばらついていた。

〔発明の効果〕

本発明によれば、ヒアルロン酸を高収率で、しかも収量にばらつきなく、安定に生産することが

できる。また菌体回収も容易である。

本発明によつて製造されたヒアルロン酸は、化粧品、医薬品に配合して使用できる。

特許出願人 電気化学工業株式会社